

EINE UNTERSUCHUNG ÜBER DIE WIRKUNG VON
GALLENSÄUREN UND BILIÄR SEZERNIERTER
SUBSTANZEN AUF DEN CORTISOLMETABOLISMUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

HELMUT RIEMENSCHNEIDER
aus Petersberg

Marburg 1974

EINE UNTERSUCHUNG ÜBER DIE WIRKUNG VON
GALLENSÄUREN UND BILIÄR SEZERNIERTER
SUBSTANZEN AUF DEN CORTISOLMETABOLISMUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

HELMUT RIEMENSCHNEIDER
aus Petersberg

Marburg 1974



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 30. Juli 1974

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. H. Gerdes

Correferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Literatur und Schrifttum	4
1. Cortisolmetabolismus	4
2. Transport und Ausscheidung von Bromsulphthalein	12
3. Gallensäurenmetabolismus	14
C. Eine Untersuchung über die Wirkung von Gallensäuren und einer biliär sezernierten Substanz (BSP) auf den Cortisolmetabolismus	18
I. Material und Methodik	18
1. Patientenkollektiv und Gewinnung des Untersuchungsmaterials	18
2. Methodik der Cortisolbestimmung	18
a) Übersicht über den Analysenvorgang	23
b) Reagentien	23
c) Instrumente	24
3. Mathematische Auswertung der Ergebnisse	24
a) Ermittlung der Cortisol- halbwertszeit	24
b) Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	26
II. Befunde und Ergebnisse	27
III. Diskussion und Ergebnisse	40
D. Zusammenfassung	47
E. Literaturverzeichnis	48

A. Einleitung und Problemstellung

Die intakte Leberfunktion ist ein wesentlicher Faktor bei der Aufrechterhaltung der hormonellen Homöostase. Die zentrale Bedeutung der Leber speziell für die Inaktivierung der Steroidhormone ist seit langem bekannt (Z o n d e k , B. 1934) und typische klinische Symptome bei Leberzirrhose, wie Gynäkomastie, Regelstörungen, Änderung der Körperbehaarung u.a. sind mit hormonellen Stoffwechselstörungen in Verbindung gebracht worden.

Mit der Entwicklung entsprechender Nachweismethoden in den letzten Jahren ist es schrittweise gelungen, die vermuteten Störungen des endokrinen Gleichgewichtes biochemisch zu erfassen und zum Teil ihre pathogenetischen Prinzipien abzuklären.

Auch für die adrenalen Steroide sind typische Veränderungen des Metabolitenmusters bei Leberzirrhose gefunden worden.

In einer neueren Arbeit von Zumoff (1967) wird der bei den meisten Lebererkrankungen mehr oder weniger vorhandenen Cholestase in der Pathogenese der metabolischen Störungen der Steroidhormone eine wesentliche Bedeutung zugemessen. Im Arbeitskreis der Marburger Klinik (G e r d e s et al. 1972) wurden diese Vermutungen in gezielten Untersuchungen weiter verfolgt. Erste orientierende Befunde zeigten dabei, daß möglicherweise die Gallensäuren bei der Beeinflussung der hepatischen Extraktion von Steroidhormonen eine Bedeutung haben. Es konnte zunächst nachgewiesen werden (K r i e b e l 1973), daß eine Beziehung zwischen dem Gallensäuregehalt in Lebergalle und der metabolischen Halbwertszeit von Cortisol besteht. Aus früheren Untersuchun-

gen (A n d r e w s 1960) war weiter bereits bekannt, daß Gallensäuren die hepatische Clearance von Bromsulphthalein kompetitiv hemmen.

Da die oben erwähnte Korrelation zunächst nur als Voraussetzung und nicht als Beweis für eine kausale Beziehung zwischen Gallensäuren- und Nebennierenrindenhormonstoffwechsel angesehen werden kann, soll in dieser Arbeit durch weitere experimentelle Befunde beim Menschen die Hypothese einer direkten Abhängigkeit der Metabolisierungsgeschwindigkeit von Cortisol vom gleichzeitigen Angebot von Gallensäuren oder ähnlich zu verstoffwechselnder Substanzen (z.B. BSP) an die Leberzelle untersucht werden.

Da bei der parenteralen Applikation bestimmter Gallensäuren (z.B. Lithocholsäure u. Chenodesoxycholsäure) nach entsprechenden Tierversuchen hepatotoxische Wirkungen auch beim Menschen nicht auszuschließen waren, mußten wir für unsere Fragestellung zum Teil einen indirekten Weg gehen, um den kurzfristigen Einfluß biliär sezernierter Substanzen auf die Cortisolhalbwertszeit zu untersuchen. Wir setzten nach den zitierten Befunden von A n d r e w s (1960) voraus, daß Substanzen, die bei ihrem Stoffwechsel in der Leberzelle eine gegenseitige kompetitive Beeinflussung zeigen (wie Gallensäuren und BSP), sich gegenüber anderen Stoffen, deren Stoffwechselort ebenfalls in der Leberzelle liegt, ähnlich verhalten. Unsere hier vorgelegten Untersuchungen gingen daher von folgenden gezielten Fragestellungen aus:

1. Können in der hepatischen Funktionsdiagnostik benutzte Substanzen, deren biliäre Sekretion durch Gallensäuren kompetitiv gehemmt wird, kurzfristige Stoffwechselveränderungen des Cortisols erzielen?

2. Welchen Einfluß haben im Langzeitversuch
oral applizierte Gallensäuren auf den
Cortisolmetabolismus?

Mit der Antwort auf diese Fragestellung sollen unsere Untersuchungen einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der Pathogenese von Stoffwechselstörungen der Steroidhormone und damit der Störungen der Funktion endokriner Organe bei Patienten mit Leberkrankheiten sein.

B. Literatur und Schrifttum

Zum besseren Verständnis der methodischen Einzelheiten und der Diskussion der Arbeitsergebnisse werden im folgenden die bisher bekannten und für die Fragestellung wichtigen Grundlagen über die drei bei den Untersuchungen zu betrachtenden Substanzen in knapper Form dargestellt. Dabei soll eingegangen werden auf

1. den Cortisolmetabolismus
2. den Transport und die Ausscheidung von Bromsulfphthalein
3. den Gallensäurenmetabolismus

1. Cortisolmetabolismus

Die Synthese der Glukokortikoide in der Zona fasciculata geht ebenso wie die Bildung der Gallensäuren vom Cholesterin aus. Die Muttersubstanz aller hormonalen Steroide ist das 5-Pregnenolon (Pregna - 5en - 3 Bol 20 - on), das durch organspezifische Enzymsysteme (NNR, Testes, Ovar) in das jeweilige Endprodukt umgewandelt wird.

In der Zona fasciculata werden täglich 20 - 30 mg Cortisol und 1,3 - 1,4 mg Corticosteron gebildet. Das Cortisol wird im Blut zu etwa 25 % von Erythrozyten absorbiert, der Rest liegt zu 90 - 95 % an Transcortin gebunden vor. Ausschließlich der freie Teil ist biologisch aktiv (H ü b e n e r und S t a i b 1965).

Der mittlere Plasmagehalt der 17-OHCS liegt bei 8 - 15 µg/100 ml (P e t e r s o n et al. 1955). Diese Angaben variieren je nach Nachweismethode, auch spielt der zirkadiane

Rhythmus bei der Höhe der Cortisolkonzentration eine Rolle. Der Plasmaspiegel des Corticosterons wird mit 0,4 - 2,0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ angegeben, macht also nur etwa 10 % der mit fluorometrischer Messung erfaßten Substanz aus.

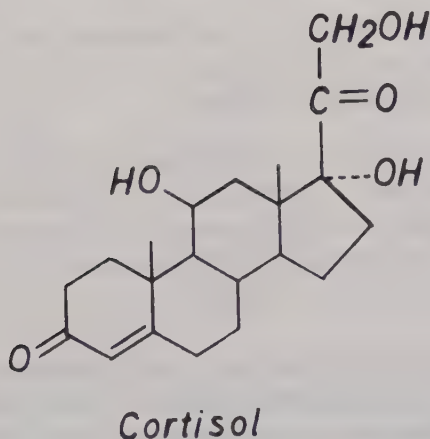


Abb. 1: Strukturformel des Cortisolmoleküls

Der zweite für die Höhe des Plasmaspiegels entscheidende Mechanismus ist die Ausscheidungsrate der Steroide. Ein Maß hierfür ist die biologische Halbwertszeit, die beim Menschen für exogen zugeführtes Cortisol bei 80 - 110 Minuten liegt (P e t e r s o n et al. 1955). Die Umsetzungs-

zeit dagegen ist mit 26 Minuten angegeben, i.e. die Zeit, in der endogen produziertes Cortisol das exogene voll ersetzt hat.

Bei der Metabolisierung der Steroide spielt die Leber die wichtigste Rolle. Zwar wird auch der Muskulatur, der Niere und den Fibroblasten eine gewisse Bedeutung bei der Inaktivierung der adrenalen Steroide zugemessen (B e r l i n e r, D.L. et al. 1960; B i r k e, G. 1962), in quantitativer Hinsicht spielen diese Stoffwechselorte jedoch keine Rolle.

Für den Abbau des Cortisols sind fünf enzymatisch gesteuerte Schritte entscheidend, die H ü b e n e r und S t a i b in einer Übersicht dargestellt haben:

- a.) Reduktion der 4 en - 3 on Gruppe im Ring A.
Dabei entstehen beim Menschen vorwiegend 3 α - Hydroxy-5- β -Steroide z.B. Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison (Mc G u i r e und T o m k i n s 1959).
- b.) Reduktion der 20-Ketogruppe mit konsekutivem Abbau der Seitenkette, wobei 20 α und 20- β Hydroxysteroidoide im gleichen Verhältnis entstehen (G o l d et al. 1959, P e t e r - s o n 1959, C e r e s a 1964).
- c.) Hydroxylierung am C-Atom 6. Es entsteht nach K a t z und Mitarbeiter (1962) 6- β -Cortisol, das als Metabolit ein wesentlicher Faktor der freien C-21 Corticosteroide darstellt.
- d.) Oxydoreduktion am C-Atom 11, die durch eine 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase vermittelt wird (H ü b e n e r 1956).

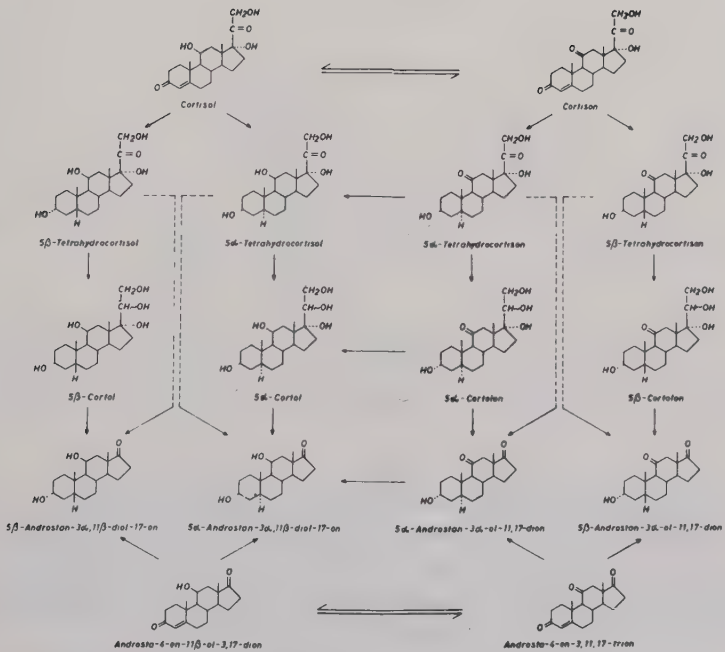


Abb. 2: Wahrscheinlicher Abbauweg von Cortisol nach einem Schema von Bush und Mahesh (1959)

- e.) Konjugation der im A-Ring reduzierten Hormone. Dabei entstehen aus den 3-Hydroxyverbindungen Glucuronide, aus den 3- β -Hydroxyverbindungen Schwefelsäureester.

Die A-Ring-Reduktion ist in quantitativer und biologischer Hinsicht die bedeutendste Reaktion zur Inaktivierung des Cortisols im Organismus. Durch die 5 α und 5- β -Reduktase wird die Doppelbindung im Ring B aufgelöst und durch Einführen von Wasserstoffatomen entstehen die Dihydroverbindungen. Dabei sind die 5 α -Derivate auf Grund ihrer planen Struktur im Gegensatz zu den 5- β -Derivaten biologisch noch aktiv (H e l l m a n n , H. et al. 1959). Beim Abbau überwiegen jedoch die inaktiven 5- β -Derivate.

Weiterhin entstehen die Tetrahydroverbindungen durch Reduktion der Keto-Gruppe in Position C 3, die mit Glucuronsäure respektive Schwefelsäure konjugiert im Urin ausgeschieden werden.

Bei der Reduktion der 20 - Keto-Gruppe entstehen im gleichen Verhältnis 20 α und 20- β -Hydroxysteroiden. Dieser Vorgang ist im Gegensatz zur Oxydoreduktion der Sauerstofffunktion am C-Atom 11 irreversibel und führt vollständig zur Inaktivierung der Substanz.

Bei Patienten mit chronischer Leberzellschädigung sind nun in den letzten Jahren einige Befunde über die Veränderung des Steroidhormonstoffwechsels und der Änderung der Funktion der steroidhormonproduzierenden Organe erarbeitet worden, die, soweit sie unsere Fragestellung berühren, referiert werden sollen.

1. Der Funktionszustand der Nebennierenrinde bei Patienten mit Leberzirrhose ist verändert. Es liegt

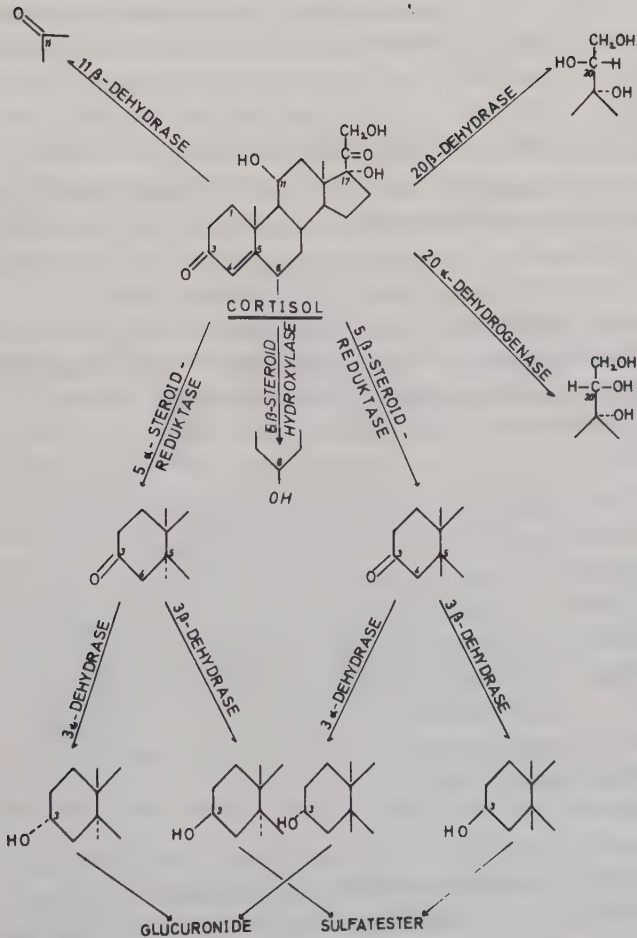


Abb. 3: Inaktivierungsreaktion am Cortisolmolekül
(Gerdes 1970)

eine Dissoziation der beiden wichtigsten Partialfunktionen vor: die Sekretionskapazität für Glukocorticoide ist eingeschränkt, die mineralocorticoiden Teilfunktion gesteigert. Normalerweise zu beobachtende tagesrhythmische Schwankungen des freien Plasma- und Harncortisols und seiner Metaboliten sind bei Patienten mit Leberzirrhose aufgehoben.

2. Die funktionellen Störungen der Nebennierenrindensekretion konnten erstmals mit morphologischen Veränderungen an den Nebennierenorganen bei Patienten mit Leberzirrhose korreliert werden (G e r d e s, H. 1970). Dem Hyperaldosteronismus entspricht eine Verbreiterung der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, die verminderte Cortisolproduktion drückt sich in einer Verschmälerung der Zona fasciculata aus.
3. Bei Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose ließen sich Änderungen des Metabolitenmusters der C_{21} -Steroide nachweisen. Das Verhältnis der an C_6 des Steroidringsystems hydroxylierten und an C_{20} hydrierten Verbindungen zu Cortisol und Cortison ist bei Zirrhose-Patienten sowohl im Plasma als auch im Urin signifikant höher als bei gesunden Personen. Das 6- β -Hydroxycortisol wird vermehrt im Urin ausgeschieden.

Plasmaspiegel und Urinausscheidung von Cortison sind bei Zirrhose-Patienten höher als bei gesunden Personen. Das Verhältnis von Cortison zu Cortisol wird größer als 1. Die zirrhotische Leber ist danach sowohl in diesem Punkt als auch hinsichtlich der Fähigkeit zur alternativen 6- β -Hydroxylierung der unreifen Leber des Neugeborenen vergleichbar.

4. Die biologische Halbwertszeit für Cortisol ist sowohl bei Patienten mit fortgeschrittener Parenchymschädigung als auch bei einfacher Cholestase ohne wesentliche Parenchymschädigung der Leber beeinträchtigt.

Für die formale Pathogenese der veränderten Nebennierenrindenfunktion bei chronischen Lebererkrankungen ergibt sich daraus im Zusammenhang mit durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen:

1. Eine Beeinflussung des Metabolisierungsprozesses von Steroidhormonen bei Patienten mit Leber-Zirrhose ist auf eine Aktivitätsänderung von Enzymen zurückzuführen.
2. Verlängerungen der metabolischen Halbwertszeit von Cortisol können jedoch auch schon allein durch eine Cholestase verursacht sein, die zu einer Sekretionsstörung für Gallensäuren führt. Zur Erklärung kann eine Störung des intrazellulären Substrattransportes durch kompetitive Hemmung diskutiert werden, da hepatische Gallensäurenexkretion und biologische Halbwertszeit von Cortisol negativ korreliert sind.
3. Die Änderungen der Leberdurchblutung haben für die Metabolisierung der Glucocorticoide keine wesentliche Bedeutung.

2. Transport und Ausscheidung von Bromsulfphthalein

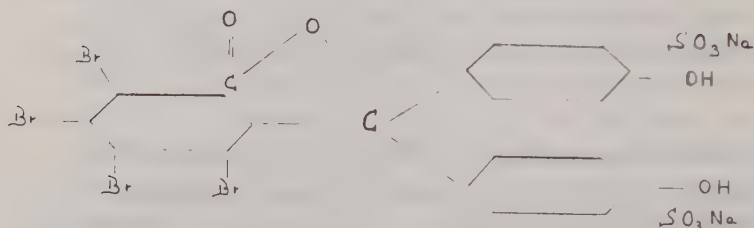


Abb. 4: Strukturformel des Bromsulfphthaleins

Bromsulfphthalein ist eine seit 1925 in der Leberdiagnostik häufig angewendete Substanz, die fast ausschließlich über die Leber biliär sezerniert wird. Im Bereich der üblicherweise intravenös applizierten Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht ist die Substanz komplett an Trägerproteine fixiert, unter anderem auch an α -1-Lipoproteine.

Für den Verteilungsmodus und für den Ausscheidungsmechanismus müssen zwei Fraktionen unterschieden werden: einmal der plasmaeiweißgebundene Teil und zum anderen der an Leberproteine fixierte Teil. Die Affinität des BSP zu den entsprechenden Leberproteinen ist wesentlich größer als zu den Plasmaproteinen, was in einer Untersuchung von Quarrfordt, H. et al. (1971) an einem Normalkollektiv von 10 Probanden beschrieben worden ist. Dieser Affinitätsunterschied zu den Leberproteinen erleichtert die Inkorporation bei der Aufnahme in die Leberzelle.

In verschiedenen Untersuchungen wird auf die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme hingewiesen. Ein Transportmaximum von Plasma in die Zelle wird von Javitt (1960) mit 5,95 mg/kg Körpergewicht angegeben und aus dieser Begren-

zung ein aktiver Transport, ein carrier-System, vermutet ohne daß bisher ein Beweis dafür vorliegt.

In der Leberzelle selbst schließt sich die Konjugation mit Glutathion mittels einer Thioäther-Kette an (J a v i t t , N.B. 1961). In dieser Form wird die nicht metabolisierte Substanz sezerniert. Dabei liegt die Sekretionsrate wesentlich unter der maximalen Aufnahmefähigkeit, was bei höherer Dosierung von BSP zu einer beträchtlichen Akkumulation in der Leber führt, wie dies auch für einige andere Substanzen beschrieben ist (A n d r e w s et al. 1960).

Über die Aufnahme und Ausscheidung sind unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Auch der Einfluß anderer biliär sezernierter Substanzen auf die Sekretion von Bromsulfphthalein ist unterschiedlich dargestellt worden (S o n g , S. et al. 1969; J a v i t t , N.B. 1960; A n d r e w s et al. 1960).

Es darf nach neueren Untersuchungen heute jedoch angenommen werden, daß etwa unter dem Einfluß der Gallensäuren (A n d r e w s 1960) die Sekretionsrate von Bromsulfphthalein verringert wird. Dabei spielt die Konkurrenz um die Eiweißbindung eine maßgebliche Rolle.

3. Gallensäurenmetabolismus

Die Gallensäuren zählen zu der Gruppe der C-24 Steroide, die sich in Zahl und Stellung der einzelnen Hydroxylgruppen voneinander unterscheiden. Ihre Synthese geht, wie die der hormonell aktiven Steroide, auf das Cholesterin zurück. Dabei sind die wichtigsten Schritte zur Synthese die Auflösung der 4-en Doppelbindung, Kürzung der aliphatischen Seitenkette um 3 C-Atome und Einführung von Hydroxylgruppen.

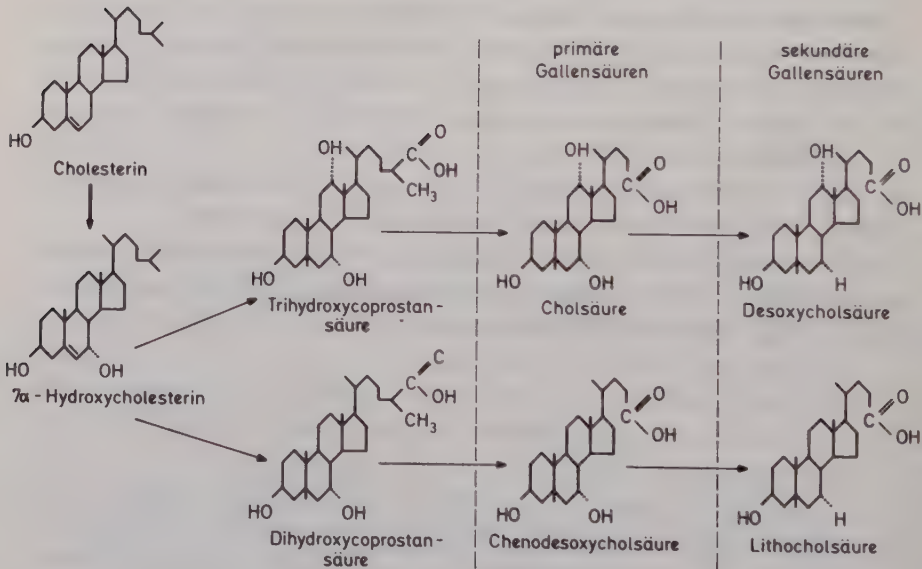


Abb. 5: Stoffwechselwege bei der Bildung der primären und sekundären Gallensäuren aus Cholesterin

Die produzierten Gallensäuren werden in säureamidartiger Bindung an Taurin respektive Glycin in einem Verhältnis von 1 zu 3,2 ausgeschieden (S o b o t t k a 1937). Diese Relation ist stark von der verfügbaren Taurinkonzentration abhängig, da das Enzymsystem die Bildung von Taurinkongugaten begünstigt. Es entstehen Glycocholat, Taurocholat, Glychenodesoxycholat und Taurodesoxycholat, deren Wasserlöslichkeit in sauren Bereichen durch die Konjugation wesentlich verbessert wird.

0,8 g/24 h Gesamtgallensäure werden im Organismus gebildet, was genau der über die Faeces ausgeschiedenen Menge entspricht. Die in das Duodenallumen entleerte Menge liegt jedoch beträchtlich höher. Hier werden ca. 20 - 30 g/d ausgeschieden und zum größten Teil über den enterohepatischen Kreislauf zur Leber zurücktransportiert. Das Lymphsystem spielt hier ebenfalls eine Rolle.

Im Darm entstehen durch bakterielle Dekonjugierung und Dehydroxylierung der primären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithocholsäure, die sekundären Gallensäuren.

Die wesentliche Bedeutung der Gallensalze liegt in ihrer Eigenschaft als Lösungsvermittler für Lipide. Diese polaren Amphiate besitzen eine hydrophobe und hydrophile Oberfläche, eine typische Eigenschaft der Detergentien. Im Duodenallumen entstehen polymolekulare Aggregate, sogenannte Micellen, die auf Grund der starken Oberflächenwirkung Lipide im wässrigen Milieu in Lösung halten können und die Bildung von Emulsionen bewirken. Hinzu kommt noch eine vermutlich durch die Gallensäuren induzierte Aktivierung der Pankreaslipasen.

Unter den Bedingungen der Cholestase ist diese normale Funktion nicht mehr möglich. Die Serumkonzentration von Gallensäuren steigt im Serum um zwei Zehnerpotenzen, die Ausschei-

dung ist naturgemäß sehr niedrig oder vollständig aufgehoben. Dementsprechend wird man auch das bakterielle Transformationsprodukt der Cholsäure, die Desoxycholsäure, nur in geringer Konzentration nachweisen können. Die Beurteilung der Konzentrationsänderung von Gallensäuren bei Cholestase ist in Arbeiten von Neal et al. und Sjövall (1960) ausführlich beschrieben. In unserer Marburger Arbeitsgruppe sind ähnliche Ergebnisse gefunden worden.

Bei Patienten mit Cholestase wurde eine mittlere Konzentration konjugierter Gallensäuren von $306,3 \mu\text{g/ml}$ hepatischer Galle ermittelt, das entspricht etwa $0,1 \text{ m\AA} \text{ g/l}$. Diese Zahl ist die Summe der Einzelgallensäuren Cholsäure, Chenodesoxycholsäure (CDCS), Desoxycholsäure (DCS) und Lithocholsäure (LCS), die im Verhältnis $0,6 : 1 : 0,2 : 0,1$ ausgeschieden werden, wobei CDCS = 1 gesetzt ist. Die freien Gallensäuren oder anomale Metaboliten lassen sich, abgesehen von Spuren in einigen Proben, nicht nachweisen. Bei cholezystektomierten Patienten liegt der Gesamtgallensäuregehalt und das Verhältnis der einzelnen Gallensäuren zueinander etwa in der Größenordnung, wie sie in den letzten Jahren von Sjövall, Wootton, Wiggins et al. mitgeteilt wurde. Danach ist bei den in der Marburger Arbeitsgruppe untersuchten Patienten mit Verschlußikterus die Gallensäurekonzentration in hepatischer Galle um etwa das 10fache reduziert. Das Verhältnis der individuellen Gallensäuren ist verändert: am auffälligsten dabei ist die Erniedrigung der Desoxycholsäure (DCS). Aber auch das Verhältnis der tri- zu den dihydroxylierten primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure ändert sich von 1,4 auf 0,6 beim Verschlußikterus. Chenodesoxycholsäure wird in vielen Fällen zur Hauptgallensäure.

Unter den Bedingungen einer Cholestase kommt es demnach zu einer quantitativen und qualitativen Änderung der Konzen-

tration der Gallensäuren im hepatischen Gallensaft. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren (S j ö v a l l , J. 1960) lassen sich dabei zwei charakteristische Merkmale erkennen:

1. Der absolute Gallensäuregehalt in hepatischer Galle ist bei Cholestase erheblich erniedrigt. Da auch aus anderen Befunden bekannt ist, daß die Serumgallensäuren bei Cholestase ansteigen, ist diese Erniedrigung der Gallensäuren in der hepatischen Galle vorwiegend auf eine Sekretionsstörung der Leberzellen zu beziehen. Die vermindert ausgeschiedenen Gallensäuren müssen sich bei zunächst ungestörter Synthese auch intrazellulär anhäufen.
2. Verschiebungen in der Relation der einzelnen Gallensäuren zueinander deuten darauf hin, daß die normalen Stoffwechselprozesse der Gallensäuren bei Cholestase in der Leberzelle anders ablaufen. Der schon von S j ö v a l l (1960) beschriebene Befund einer Änderung des Verhältnisses der tri- zu den dihydroxylierten primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure bei Cholestase konnte im Marburger Arbeitskreis in mehreren Untersuchungen ebenfalls nachgewiesen werden. Nach den inzwischen in etwa bekannten Stoffwechselwegen bei der Bildung der primären und sekundären Gallensäuren muß bei Cholestase auf eine Störung der 12 - α -Hydroxylierung der Gallensäuren geschlossen werden. Der alternative Stoffwechselweg zur Chenodesoxycholsäure und Lithocholsäure gewinnt an Bedeutung.

Die Antwort auf die eingangs beschriebene Fragestellung dieser Arbeit soll ausgehend von den oben referierten Befunden ein weiterer Beitrag zur Abklärung der Pathogenese hormoneller Störungen bei Leberkranken sein. Zur Lösung der gestellten Aufgabe wurde die nachstehend geschilderte Versuchsanordnung benutzt.

C. Eine Untersuchung über die Wirkung von Gallensäuren
und einer biliär sezernierten Substanz (BSP) auf den
Cortisolmetabolismus

I. Material und Methodik

1. Patientenkollektiv und Gewinnung des Untersuchungsmaterials
 - a) Zur Beantwortung der ersten Frage, ob BSP die Metabolisierungsgeschwindigkeit von Cortisol zu beeinflussen vermag, wurde bei einer Gruppe von 14 Patienten ohne Leberfunktionsstörungen im Alter von 15-66 Jahren die Cortisolhalbwertszeit nach Gabe von 100,0 mg Hydrocortison und einen Tag später unter gleichzeitiger intravenöser Verabreichung von 5 mg/kg Körpergewicht BSP bestimmt.
 - b) Bei einer Gruppe von 6 Patienten zwischen 52 und 65 Jahren mit klinisch gesicherter Cholelithiasis wurden aus therapeutischen Gründen über sechs Wochen CDCS bzw. LCS gegeben. Zu Beginn und mit Abschluß der Behandlung wurde die Cortisonhalbwertszeit bestimmt.

2. Methodik der Cortisolbestimmung

Zur Bestimmung des freien Cortisols wurde ein modifiziertes Analysenverfahren verwendet, das G e r d e s und S t a i b 1965 für Harnuntersuchungen beschrieben haben. Eine ähnliche Arbeit liegt speziell für die Bestimmung von Cortikosteroiden in kleinen Plasmamengen von S t a h l et al. (1963) vor.

1. Patientenkollektiv

<u>Patient</u>	<u>Diagnose</u>	<u>Labordaten</u>
K.Kö. 51 J.	essentielle Hypertonie	im Normbereich
E.Eb. 60 J.	Herzinsuffizienz	" "
R.Re. 15 J.	Asthma bronchiale	" "
R.Th. 62 J.	unklare Kreislauf- beschwerden	" "
J.Ge. 33 J.	Ostoporose	" "
P.Gr. 53 J.	Angina pectoris Syndrom	GOT/GPT 16/19 Bilirubin 0,7 mg %
A.Ku. 46 J.	Ovarialtumor	E-phorese 7,5 g % 58/2,5-75 18-14
M.Vi. 66 J.	Hirnembolie	im Normbereich
B.Le. 48 J.	abdomineller Hodgkin	" "
M.Se. 63 J.	Cholelithiasis	" "
K.Ko. 59 J.	Pyelonephritis	E-phorese 7,5 g % 53,5-2,5-8,5-17,0-19,0
V.DS. 41 J.	Zustand nach Virusinfek- tion	im Normbereich
H.Jö. 58 J.	Gastritis	" "
P.Mu. 54 J.	Bronchial-Ca	GOT/GPT 18/44 alk. Phosphotase 94

2. Patientenkollektiv

L.Ku. 52 J.	Gallensteine	im Normbereich
B.Kü. 65 J.	Gallensteine	BSG 47/83
M.St. 53 J.	Cholelithiasis	im Normbereich
V.Iv. 43 J.	Gallensteine	" "
K.Sch. 53 J.	Gallensteine	" "
M.Se. 63 J.	Cholelithiasis	" "

Tabelle 1: untersuchtes Patientenkollektiv

Das Prinzip dieser fluorometrischen Bestimmung geht von dem spezifischen Anregungs- und Fluoreszenzspektrum der Steroide aus. So verwendet man Anregungsstrahlen von 436 nm und einen Sekundärfilter von 500 - 3000 nm, mit denen man gegen einen Leerwert und im Vergleich mit dem sogenannten Ittrichstandard das Fluoreszenzgemisch mißt (A b r a h a m und S t a u d i n g e r 1964).

Die Spezifität dieses Meßvorganges ist bei vorheriger dünn-schicht-chromatographischer Abtrennung des Cortisols von den übrigen Fraktionen sehr gut (D ö r n e r und S t a h l 1965).

Für die vorliegende Untersuchung wurde auf den Schritt der DS-Trennung verzichtet. Dadurch wurden neben dem freien Cortisol zwar auch noch andere Steroidhormonfraktionen in der Messung miteingefasst, die vor und nach Applikation von BSP im Kurzzeitversuch oder CDCS bei den Langzeitversuchen gleich sein dürften, so daß ein Vergleich der erhaltenen Werte zulässig ist.

S w e a t (1954) hat in einer Untersuchung jene Substanzen bestimmt, die im Bereich des spezifischen Cortisol-spektrums ein durch Schwefelsäure induzierbares Fluoreszenzmaximum besitzen: es handelt sich um Corticosteron (Pregna-4 en-11 β , 21-diol-3, 20 dion), Cortisol (Pregna-4 en-11 β , 17, 21-triol-3, 20 dion) und Pregna-4en11 β , 17, 20 β , 21-tetrol-3-on- (Reichstein's Compound E.). Da bei unserer Fragestellung eine streng quantitative Auswertung nicht erforderlich war, spielten Corticosteron und Reichstein's Compound E keine Rolle.

Im einzelnen wurde folgender Arbeitsgang nach Abnahme des heparinisierten Blutes durchgeführt:

Bei 3000 U/min wurde das Blut 5 Minuten zentrifugiert und anschließend 3 ml Plasma in ein 20 ml Schliffzentrifugen-glas gegeben. Der Extraktionsvorgang wurde mit 15 ml Essig-

säureäthylester durchgeführt. Zur gründlichen Trennung ließen wir die ca. vier Plasmaproben von zwei mitgeführten Standards von 50 bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ 10 min in einem Schüttelapparat laufen. Die Suspensionen wurden wieder bei 3000 U/min ungefähr 5 min abzentrifugiert und anschließend 12 ml Essigsäureäthylester abgesaugt und in 50 ml-Standardzylinder überführt. Der Waschvorgang, der sich hier anschloß, begann mit einer 0,1 normalen Natronlauge. Mit der Natronlauge wurden die in der Probe vorhandenen aromatischen Substanzen Östradiol, Östriol, Östron eliminiert. Die Neutralisierung wurde mit 2,0 n Essigsäure durchgeführt und überschüssiges Wasser mit Hilfe von hygroskopisch wirkendem Na_2SO_4 aus der Lösung beseitigt.

10 ml des Athylacetats wurden in 50 ml Rundkolben gegeben und das Gemisch bei maximal 40°C Wassertemperatur in einem Rotationsverdampfer abgedampft.

Der Rückstand in 11 ml Dichlormethan aufgenommen wurde vorsichtig 1 min in den geschlossenen Gläsern geschüttelt.

10 ml des Dichlormethans wurden in ein 20 ml Schliffzentrifugenglas gegeben, 3 ml eines frisch hergestellten Fluoreszenzgemisches hinzugegeben.

Das Gemisch bestand aus Schwefelsäure und Äthanol p.a. in einem Verhältnis von 7 : 3. Ein wesentlicher Faktor in dem gesamten Meßvorgang ist die konstante Temperatur von 15°C für diese Lösung, auf deren Einhaltung unbedingt geachtet werden muß, da sonst die Meßgenauigkeit so gering ist, daß keine signifikanten Ergebnisse zu erwarten sind.

Dichlormethan und das Fluoreszenzgemisch wurden bei laufender Stoppuhr eine Minute gut durchgeschüttelt, die obere Phase, Dichlormethan, mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und der Rest vorsichtig in eine 3 ml Quarzküvette eingefüllt.

Die Meßzeiten waren zwei Minuten und fünf Minuten nach dem Einfüllen des Fluoreszenzgemisches in das 20 ml Schliff-zentrifugenglas bei Verstärkungsstufe 7 im Eppendorf-Photometer.

Die exakte Messung des Zwei- und Fünfminutenwertes mit Hilfe der Stoppuhr ist die Grundlage der Halbwertszeitbestimmung. In diesem Zeitraum liegt das Fluoreszenzmaximum für Cortisol und Corticosteron, das in den ersten zwei Minuten eine Reaktionsverzögerung aufweist im Gegensatz zu den erwähnten aromatischen Substanzen wie Östrogene und Spironolacton, die in den ersten zwei Minuten eine beträchtliche Fluoreszenz zeigen, die aber wie beschrieben entweder eliminiert werden oder wie Spironolacton zur Behandlung der Patienten zum Zeitpunkt der Versuchsreihe nicht verwendet wurde.

Eine Korrektur des ersten Meßwertes, des Zweiminutenwertes, ist nötig, um die Eigenfluoreszenz des Plasmas und eventuell noch vorhandener unspezifischer Fluorogene aus dem Meßwert zu beseitigen. Als entsprechender empirisch ermittelter Faktor ist in einer Untersuchung von D ö r n e r und S t a h l (1965) 1,1 angegeben, mit dem der Zweiminutenwert multipliziert wird. Die Ermittlung der 11-Hydroxycorticosteroid-Konzentration vollzog sich dann nach folgendem Schema:

Multiplikation des ersten Meßwertes von 1,1 und Subtraktion von dem Fünfminutenwert. An einem Beispiel eines 50 µg % Standards:

5 min		2 min		korrigierte Skalenteile
48	-	(16 x 1,1)	=	20,4

Die Plasmakonzentration wurde durch Vergleich mit dem Standard errechnet.

Die mitgeführten Standards wurden aus einer Stammlösung hergestellt, die aus 100 ml Äthanol als Lösungsgrundlage für 50 mg Hydrocortison bestand. Von dieser Lösung wurde 1 ml 1000 ml aqua bidest zugesetzt. Das entsprach einer Konzentration von 50 μ g in 100 ml Wasser.

a.) Übersicht über den Analysenvorgang

1. Extraktion von 3 ml Plasma mittels 15 ml Essigsäureäthylester
2. Waschen von 12 ml des Extraktes mit 2 ml 0,1 n NaOH, mit 2,0 ml 2,0 n Essigsäurelösung
3. Behandlung mit hygroskopischen Na_2SO_4 zur Entfernung noch vorhandenen Wassers
4. 10 ml Äthylacetat in 50 ml Rundkolben abdampfen
5. Rückstand mit Dichlormethan aufnehmen
6. Schwefelsäure Äthanolgemisch (15°C) hinzugeben und durchschütteln
7. Messen im Eppendorf-Photometer
Primärfilger HG 405 - 436 nm
Sekundärfilter HG 500 - 3000

b.) Reagentien

1. Dichlormethan
2. Essigsäureäthylester
3. Alkohol p. a.
4. Schwefelsäure 96 %ig
5. 0,1 n NaOH
6. 2,0 n Essigsäure
7. wasserfreies Na_2SO_4

c.) Instrumente

1. Eppendorf-Photometer
2. Rotationsverdampfer
3. Schüttelapparat (Kottermann)
4. Glasutensilien
 - 50 ml Rundkolben
 - 20 ml Schliffzentrifugengläser
 - 50 ml Standzylinder
 - 50 ml Schliffzentrifugengläser
 - Glastrichter
5. Filterpapier für Glastrichter

3. Mathematische Auswertung der Ergebnisse

a. Ermittlung der Cortisolhalbwegszeit

Die rechnerische Auswertung der Meßdaten geht von einer Exponentialfunktion aus, die nach empirischen Gesichtspunkten den Abfall zahlreicher endogener und exogener Substanzen im Serum in eine genaue mathematische Vorschrift faßt.

$$C_B = C_A \cdot e^{-k \cdot t}$$

C_A und C_B sind die Konzentrationen des Cortisols zum Abnahmezeitpunkt A bzw. B, t ist der zwischen beiden Abnahmetermen liegende Zeitraum und k eine konstante Größe, die als Assimilationskonstante bezeichnet wird.

Durch Umformung und Übertragung in dekadische Logarithmen läßt sich eine handlichere Form ermitteln:

$$k = \frac{(\log C_A - \log C_B) \cdot \ln 10}{t}$$

Für die Bestimmung der Halbwertszeit gilt dementsprechend:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k}$$

Als Ausgangspunkt der Berechnungen wurden die Meßdaten nach intravenöser Gabe von 100 mg Cortisol verwendet und aus vier bis sechs Einzelkonzentrationen die Halbwertszeit als arithmetisches Mittel aller Halbwertszeiten zwischen den einzelnen Abnahmezeitpunkten bestimmt. Die Meßdaten wurden zusätzlich in semilogarithmischer Form als Funktion der Zeit graphisch dargestellt. Bei drei Patienten soll das Ergebnis exemplarisch dargestellt werden.

1. Die erste Kurve (Abb. 6 Seite 32) zeigt den Abfall der Cortisolkonzentration ohne und mit BSP. Die Halbwertszeit beträgt ohne Verabreichung von BSP 68 min, mit BSP 113 min.
2. Die zweite Kurve (Abb. 8 Seite 37) gibt die Plasma-Cortisolkonzentration vor und nach sechswöchiger CDCS-Therapie in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Vor der Behandlung beträgt die Halbwertszeit 95,1 min, nach der Behandlung 63,4 min.
3. Die Plasma-Cortisolkonzentration unter Behandlung mit 0,25 g LCS/d. über sechs Wochen ändert sich in ähnlicher Form, wie unter Gabe von 0,5 g CDCS/D. Die Halbwertszeit beträgt vor Therapiebeginn 98 min, nach sechs Wochen 59 min (Abb. 10 Seite 39).

b. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Auswertung hat zum Ziel, die Reproduzierbarkeit der Versuche zu beweisen und signifikante Unterschiede zwischen den vergleichbaren Meßreihen aufzuzeigen. Die Darstellung der Präzision (S a c h s , L. 1968) erfordert die Bestimmung der Standardabweichung und der Vertrauensgrenzen.

1. Standardabweichung und Mittelwert sind Charakteristika einer Normalverteilung. Die Standardabweichung ist gleich der Wurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abweichung. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

2. Die Vertrauensgrenzen wurden für die vier Meßreihen errechnet. Dabei ist nach dem Prinzip der größten Mutmaßlichkeit eine Schätzung des Gesamt-Parameters durchgeführt worden; bei diesem Vorgehen muß jedoch immer eine Unsicherheit berücksichtigt werden. Für die Kollektive wurde mit Hilfe des t-Tabellenwertes und dem Wert der Standardabweichung s die Vertrauensgrenzen nach der Formel bestimmt:

$$\mu_0, \mu_{\bar{u}} = \bar{x} \pm \frac{s \cdot t_{0.05}}{\sqrt{N}}$$

Wesentlich für die Glaubwürdigkeit zweier Gruppenbedingungen ist die Bestimmung der Signifikanz. Sie orientiert sich dabei an der Streubreite zweier relativer Häufigkeiten. Diese Statistik von Merkmalen, d.h. "von quantitativen Größen", fordert als Ergebnis eine "außerhalb der wahrscheinlichen Streubreite liegende Abweichung zweier Mittelwerte ganzer Reihen". Die nachstehende Formel wurde zur Signifikanzberechnung verwendet:

$$\mu_D = \pm \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{n_1(n_1 - 1)} + \frac{\sum d_i^2}{n_2(n_2 - 1)}}$$

II. Befunde und Ergebnisse

Im folgenden sind die Meßdaten in tabellarischer und grafischer Form dargestellt.

1. Die Kurzzeitversuche, in denen eine kausale Beziehung zwischen dem Bromsulfphthalein und der Cortisol-Halbwertszeit nachzuweisen war, sind in den Tabellen 2 - 5 und in Abb. 6 und 7 zusammengefaßt.

Tabelle 2 und 3 geben für 14 Probanden der ersten Versuchsreihe die Cortisolkonzentrationen zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten wieder, sowie die daraus rechnerisch ermittelten Halbwertszeiten.

Für die Versuche ohne Gabe von Bromsulfphthalein resultiert eine mittlere Halbwertszeit von 73,6 min, unter dem Einfluß von BSP verlängert sich die Metabolisierungsgeschwindigkeit um 49,3 min auf 122,9 min.

Als exemplarisches Beispiel sind in Tabelle 4 und 5 die im Eppendorf-Photometer gemessenen Skalenteile wiedergegeben. Sie zeigen die Plasma-Cortisolkonzentration bei einem 58jährigen Probanden. Zusätzlich wurde in semilogarithmischer Form die Cortisolkonzentration als Funktion der Zeit dargestellt (Abb. 6 Seite 32). Die beiden Kurven geben deutlich die veränderten Halbwertszeiten wieder, die bei diesem 58jährigen Patienten vor Gabe von BSP 68 min und nach Applikation von BSP 113 min betrug.

In Abb. 7 sind für das Gesamtkollektiv die mittleren Halbwertszeiten mit den entsprechenden Vertrauensgrenzen für die Serumcortisolkonzentration ohne und mit Einfluß von BSP gegenübergestellt.

Für $p = 0,05$ sind die Vertrauensgrenzen vor Applikation von BSP $\mu_u; \mu_o = 73,6 \pm 4,537$, unter dem Einfluß von BSP liegen sie bei $122,9 \pm 16,58$. Aus Abbildung 6 ist der Unterschied zwischen beiden Kollektiven und die Breite der Vertrauensgrenzen ersichtlich.

Im Student-Test errechnet sich für diesen Kurzzeitversuch ein signifikanter Unterschied mit einem t-Wert von 6,24 bei einem Kollektiv von 14 Patienten.

Tab. 2: Plasmacortisolkonzentration (C) nach Cortisolinfusion

Abnahme- zeitpunkt	Patienten		E.Eb. C μ g/100ml	R.Re. C μ g/100ml	R.Th. C μ g/100ml	J.Ge. C μ g/100ml	P.Gr. C μ g/100ml	A.Ku C μ g/100ml
	K.Kö. C μ g/100ml							
30'	137,6		79,6	225,3	77,9	145,4	147,4	153,8
60'	88,4		52,6	165,9	52,9	79,9	71,2	103,1
90'				102,5				
120'	50,6		38,6	78,6	36,1	59,8	51,4	68,6
180'			19,9			32,8	33,8	

errechnete	64,3	71,9	62,5	81,3	82,7	85,7	77,5
Cortisol-							
calculated							

Abnahme- zeitpunkt	Patienten		B.le. C/ug/100ml	M.Se. C/ug/100ml	K.Ko. C/ug/100ml	V.DS. C/ug/100ml	H.Jö. C/ug/100ml	P.Mu. C/ug/100ml
	M.Vi.	C/ug/100ml						
30'	114,9		81,2	113,8		101,3	132,7	168,4
60'	86,9		57,5	77,0	59,6	58,0	97,6	104,0
90'				61,6	42,3			
120'	49,7		32,7	41,8	34,6	40,9	53,1	60,5
180'			22,5		20,2		28,8	

errechnete	74,4	71,5	73,3	80,5	77,0	68,0	60,0
Cortisol-							
halbwegs-							
zeit							

ohne Bromsulphthalerin:	mittlere Halbwertszeit	73,6 min
-------------------------	------------------------	----------

Tab. 3: Plasmacortisolkonzentration (C) nach Cortisolinfusion

Abnahme- zeitpunkt	Patienten		E.Eb. C/ug/100ml	R.Re. C/ug/100ml	R.Th. C/ug/100ml	J.Ge. C/ug/100ml	P.Gr. C/ug/100ml	A.Ku. C/ug/100ml
	K.Kö. C/ug/100ml							
30'	80,5		50,8	160,6	70,8	113,0	118,5	146,3
60'	61,2		40,0	123,1	53,6	91,0	84,0	119,1
90'				107,1			74,4	
120'	42,0		31,3	80,4	43,6	62,9		65,1
180'	31,0					56,5	49,0	
240'								
errechnete								
Cortisol-	107,8		127,9	98,5	155,1	197,6	110,6	99,9
halbwegs-								
heit								

Abnahme- zeitpunkt	Patienten		B.I.e. C/ug/100ml	M.Se. C/ug/100ml	K.Ko. C/ug/100ml	V.DS. C/ug/100ml	H.Jö. C/ug/100ml	P.Mu. C/ug/100ml
	M.Vi.	C/ug/100ml						
30'	173,2			126,8		92,0	124,8	105,6
60'	121,0		151,9	89,8	69,2	81,3	92,4	94,2
90'			135,2	71,8				64,1
120'	97,6			60,2		58,0	70,4	40,5
180'	74,2		72,2		38,5	41,5	49,1	
240'			35,1		30,1			
errechnete								
Cortisol- halbwegs- zeit	120,5		102,0	120,5	156,1	118,1	112,7	93,3

unter Bromsulphthalerin:

mittlere Halbwertszeit	122,9 min
------------------------	-----------

H. Jö. 59 J.

Probe	2 min	5 min	Verst.	korr.Skt.	$\mu\text{g}/100 \text{ ml}$
	<u>Skt</u>	<u>Skt</u>			
St. I	41	60	7/7	14,9	50,00
St. II	31	75	7/7	30,9	100,00
0	32	43	7/7	7,8	25,54
¹ (30')	35	79	7/7	40,5	132,67
² (60')	32	65	7/7	29,8	97,61
³ (120')	34	54	7/7	16,2	53,06
⁴ (180')	32	46	7/7	8,8	28,83

Tabelle 4: gemessene Skalenteile (Skt) ohne BSP $T_{0,5} = 68,04$
 Beispiel eines Meßvorganges bei der
 Bestimmung der Cortisolhalbwertszeit
 ohne BSP

Probe	2 min	5 min	Verst.	korr.Skt.	$\mu\text{g}/100 \text{ ml}$
	<u>Skt</u>	<u>Skt</u>			
St. I	41	60	7/7	14,9	50,00
St. II	31	75	7/7	30,9	100,00
0	36	48	7/7	8,4	27,52
¹ (30')	29	71	7/7	38,1	124,80
² (60')	26	57	7/7	28,2	92,36
³ (120')	35	60	7/7	21,5	70,42
⁴ (180')	40	59	7/7	15,0	49,14

Tabelle 5: gemessene Skalenteile (Skt) unter BSP $T_{0,5} = 112,67$
 Beispiel eines Meßvorganges bei der
 Bestimmung der Cortisolhalbwertszeit
 unter BSP

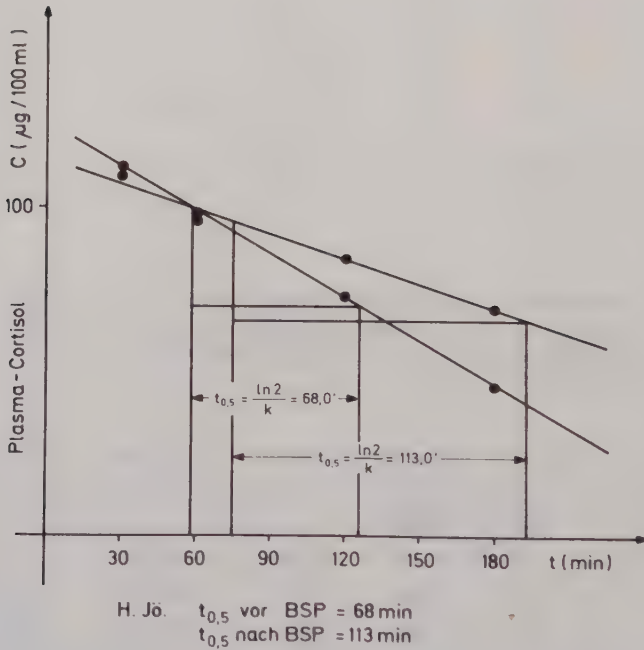
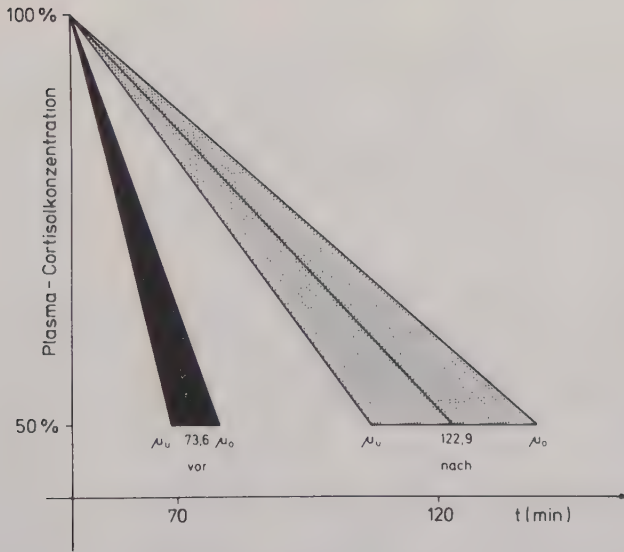


Abb. 6: Abfall der Cortisolkonzentration ohne (68,0') und mit gleichzeitiger Gabe von BSP (113,0')



Cortisolhalbwegszeit
 vor und nach Gabe von BSP
 Vertrauensgrenzen für $2p = 0,05$
 ($\mu_u - \mu_o$)

Abb. 7

2. Im Langzeitversuch mit täglicher oraler Gabe von 0,5 g CDGS bzw. 0,25 g LCS zur therapeutischen Auflösung von Gallensteinen, ein Kollektiv von 6 Patienten umfassend, wurden die in Tabelle 6 und 7 sowie in Abbildung 8, 9 und 10 dargestellten Ergebnisse ermittelt.

Tabelle 6 und 7 geben die Plasmacortisolkonzentrationen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wieder, gleichzeitig die sich daraus ermittelnde Halbwertszeit und für beide Versuchsreihen die jeweilige mittlere Halbwertszeit vor und nach sechswöchiger Applikation von CDGS.

Für einen Probanden wurde in Abbildung 8 der Abfall der Cortisolkonzentration vor Applikation und nach sechswöchiger Gabe von CDGS wiedergegeben. Dabei verkürzt sich die Halbwertszeit von 95,1 min um 32,3 min auf 63,4 min.

Die Gegenüberstellung beider Versuchsreihen in Abbildung 9 mit Darstellung der mittleren Halbwertszeit und der zugehörigen Vertrauensgrenzen der Plasmacortisolkonzentration macht den auch rechnerisch bereits dargestellten signifikanten Unterschied deutlich.

In Abbildung 10 ist ein Einzelversuch dargestellt. Hier ist der Patient sechs Wochen lang mit 0,25 g LCS behandelt und wie bei dem Versuch mit CDGS die Halbwertszeiten des Serumcortisols bestimmt worden. Wie die Abbildung zeigt, ergibt dieser Versuch ein ähnliches Ergebnis. Und zwar verringert sich die Halbwertszeit vor Applikation von LCS von 98,0 min auf 59,0 min nach der sechswöchigen Therapiedauer.

Tab. 6: Plasmacortisolkonzentration (C) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$

Patienten						
Zeitpunkt nach Cortisol- infusion	Se. C $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Iv. C $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Kü. C $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Ku. C $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Sc. C $\mu\text{g}/100\text{ml}$	St. C $\mu\text{g}/100\text{ml}$
60'	69,2	120,0	102,1	82,4	70,3	60,0
90'	57,1	104,3	85,8	66,0	58,2	52,0
120'	45,9	78,5	65,9	53,2	50,0	46,3
errechnete Halbwerts- zeit in min	101,71	99,56	108,6	95,1	123,5	162,2 min

Plasmacortisolkonzentration
nach Cortisolinfusion und
vor Applikation von CDCS

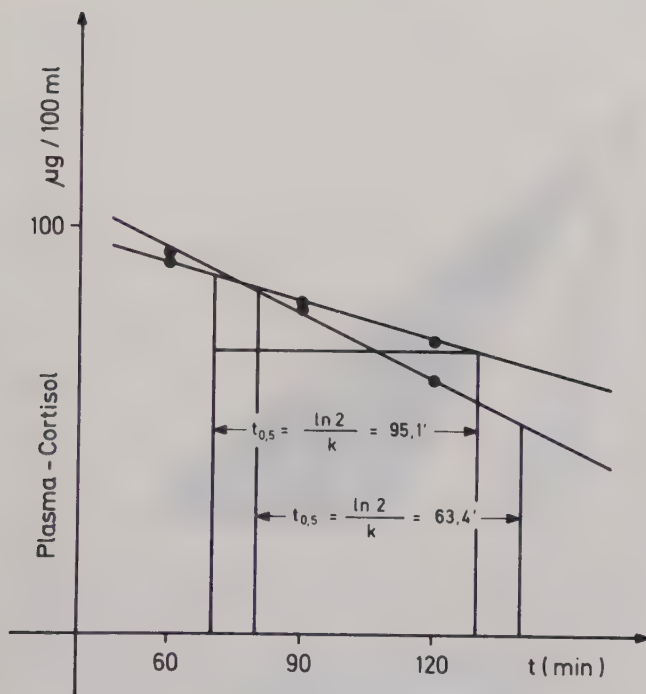
mittlere Halbwertszeit 115,1 min

Tab. 7: Plasmacortisolkonzentration (C) $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$

Zeitpunkt nach Cortisol- infusion	Patienten					St. $\mu\text{g}/100\text{ml}$
	Se. $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Iv. $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Kü. $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Ku. $\mu\text{g}/100\text{ml}$	Sc. $\mu\text{g}/100\text{ml}$	
60'	65,0	92,1	98,0	86,5	64,6	90,9
90'	45,2	71,0	70,2	64,2	64,2	60,0
120'	32,7	50,3	46,1	44,6	39,8	40,3
errechnete Halbwertszeit in min	60,9	70,1	55,9	63,4	48,6	51,2 min

Plasmacortisolkonzentration
nach Cortisolinfusion und
nach Applikation von ODGS

mittlere Halbwertszeit 58,3 min

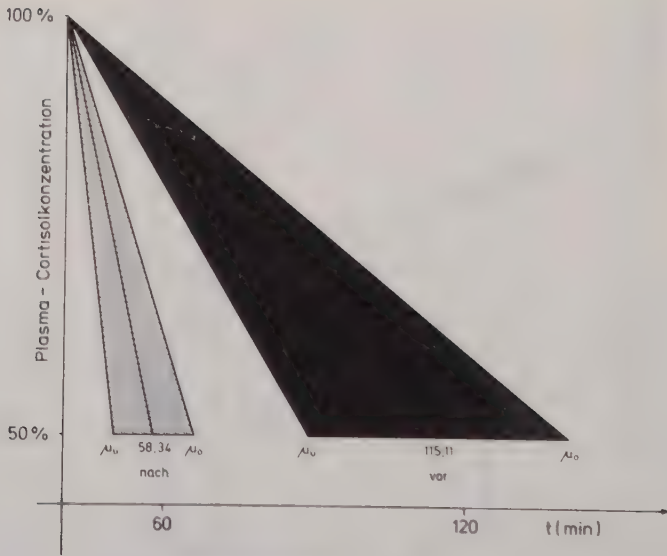


Patient Ku.

$t_{0,5}$ vor CDCS = 95,1 min

$t_{0,5}$ nach CDCS = 63,4 min

Abb. 8: Abfall der Cortisolkonzentration vor (95,1') und nach (63,4') sechswöchiger Applikation von CDCS



Cortisolhalbwertszeit
vor und nach Behandlung mit CDCS
Vertrauensgrenzen für $2p = 0,05$
($\mu_u - \mu_o$)

Abb. 9

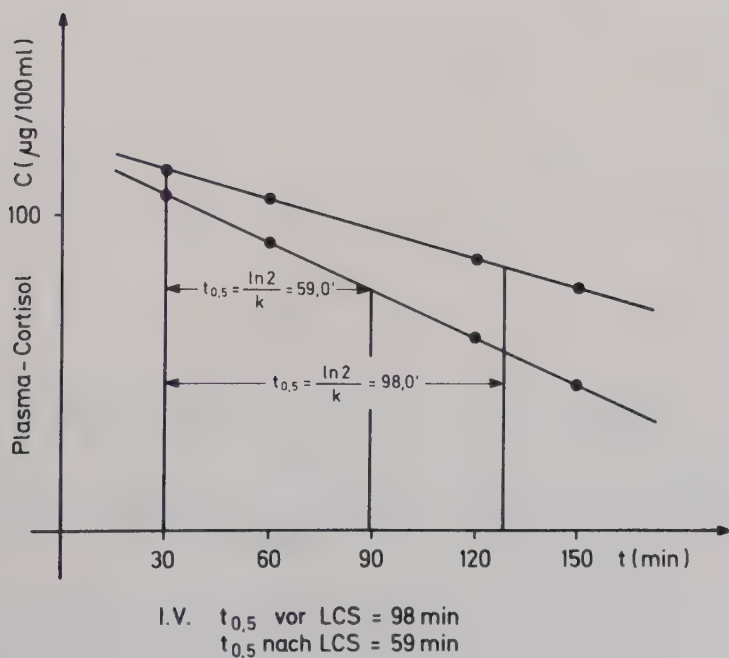


Abb. 10: Abfall der Serum-Cortisolkonzentration vor (98,0') und nach (59,0') sechswöchiger Gabe von LCS

III. Diskussion und Ergebnisse

Die Hypothese einer Kompetition von endogenen Substraten an einem gemeinsamen Stoffwechselort war Ausgangspunkt unserer in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Es sollte speziell geklärt werden, ob Änderungen des Stoffwechsels der Gallensäuren in der Leber die hepatische Clearance und Metabolisierungsgeschwindigkeit des adrenalen Glucocorticoids Cortisol beim Menschen beeinflussen. Ziel des Vorhabens sollte dabei sein, weitere Aufschlüsse über die Pathogenese der bisher bekannt gewordenen und biochemisch definierten Änderungen eines Teils der Nebennierenrindenfunktion (glucocorticoide Partialfunktion) bei Patienten mit Leberkrankheiten zu gewinnen.

Da eingangs bereits referierte Voruntersuchungen (G e r - d e s , K r i e b e l , L i t t m a n n u. D ö l l e) ergeben hatten, daß unter Cholestasebedingungen Änderungen der Gallensäurenkonzentration und des Metabolitenmusters mit einer Verlängerung der hepatischen Clearance von Cortisol korrelieren, war die Voraussetzung gegeben, daß möglicherweise ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Gallensäure- und Nebennierenhormonstoffwechsel in der Leber besteht. Es lag deshalb nahe, die Richtigkeit dieser Hypothese in einer beim Menschen durchführbaren Versuchsanordnung weiter zu erhärten. Dazu mußten aus bestimmten Gründen zum Teil indirekte Wege beschritten werden, die in der Schilderung der Versuchsanordnung bereits dargestellt wurden.

In der ersten Versuchsreihe ging es uns darum nachzuweisen, ob eine kurzfristige Erhöhung der intrahepatischen Konzentration einer vorwiegend biliär sezernierten Substanz die Metabolisierungsgeschwindigkeit von Cortisol zu beeinflussen vermag. Für unsere spezielle Fragestellung wäre die

parenterale Applikation einer Gallensäure an sich notwendig gewesen. In einer Reihe früherer Untersuchungen ist jedoch bei parenteraler Gabe zumindest im Tierversuch über hepatotoxische Wirkungen von Gallensäuren berichtet worden. Der Lithocholsäure wurde dabei sogar ein "cirrhogener" Effekt zugeschrieben. Obwohl für den Menschen solche Auswirkungen bisher nicht bewiesen werden konnten, so mußten wir bei unserer Fragestellung in Kenntnis dieser Befunde auf die intravenöse Applikation von Gallensäuren verzichten. Als Ausweg untersuchten wir deshalb die Kompetition von Cortisol mit einer Substanz, von der bereits aus früheren Ergebnissen bekannt war, daß sie ihrerseits mit den Gallensäuren um den Stoffwechselort Leberzelle konkurriert (A n d r e w s et al. 1960). Es handelt sich dabei um den bekannten Farbstoff Bromsulphthalein. Auf diese Art wollten wir wenigstens einen indirekten Hinweis über eine mögliche gegenseitige Beeinflussung von Substanzen erhalten, die das gemeinsame Merkmal haben, in der Leber metabolisiert und zum Teil biliär sezerniert zu werden. Der mögliche Einfluß von Gallensäuren selbst, ist im Gegensatz zu BSP bei der chemischen Ähnlichkeit mit den hormonalen Steroiden weder in der Wirkungsart noch in der Intensität durch unser Vorgehen voll zu erfassen, was die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse natürlich erschwert.

Es ist deshalb um so bemerkenswerter, daß wir unter den beschriebenen Bedingungen eine signifikante Verlängerung der metabolischen Halbwertszeit von Cortisol von 73,6 auf 122,9 min bei gleichzeitiger Gabe von BSP nachweisen konnten.

Allerdings war uns klar, daß es sich bei der nachgewiesenen Wechselwirkung von BSP und Cortisol bei der unterschiedlichen chemischen Struktur dieser Substanzen, wahrscheinlich um eine unspezifische Konkurrenz, möglicherweise

über den Mechanismus intrazellulärer Proteinbindungen oder vielleicht reversibler Aktivitätsänderungen spezifischer Enzyme durch die physikalische Eigenschaft von BSP handelt. Trotzdem ist festzuhalten, daß die unter anderem Gesichtspunkt erhobenen früheren Befunde von A n d r e w s (1960) bestätigt werden, die gezeigt haben, daß hormonale Steroide die BSP-Retentionszeit durch Konkurrenz beeinflussen. Außerdem gewinnen die Vermutungen von Z u m o f f (1968) an Wahrscheinlichkeit, daß Gallensäuren unter den klinischen Bedingungen der Cholestase für die Pathogenese der hepatischen Steroidhormonstoffwechselstörungen eine wesentliche Bedeutung haben.

Für die Wechselwirkung zwischen intrazellulärer Gallensäurekonzentration und Cortisolabbau sind nach neueren Untersuchungen neben der chemischen Ähnlichkeit der Substanzen zusätzlich bekannte physikalische Eigenschaften der Gallensäuren als Erklärung heranzuziehen.

Die Hypothese des anzunehmenden kausalen Zusammenhanges kann jedenfalls durch die Befunde über den Mechanismus der Cholestase aus dem Arbeitskreis von H u t t e r e r , D e n k , S c h e n k m a n n , B a c h i m , S c h a f f n e r und P o p p e r weiter gestützt werden.

Diese Autoren konnten nämlich 1969 nachweisen, daß bei Cholestase die Hydroxylierung der Gallensäuren gestört ist und daß dieses Phänomen morphologisch mit einem "hypoaktiven" endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten korreliert werden kann. Sowohl in-vitro als auch in-vivo Versuche haben dann 1970 aus dem gleichen Arbeitskreis (H u t t e r e r et al.) zeigen können, daß dihydroxylierte Gallensäuren für die Störung der Aktivität des endoplasmatischen Retikulums verantwortlich sind. Funktionell äußerten sich die nachweisbaren morphologischen Veränderungen in einer Schädigung des Cytochrom P-450 Enzymsystems.

Aus früheren Untersuchungen ist jedoch bekannt, daß Cytochrom P-450 als Endoxydase des NADPH-abhängigen mikrosomalen Enzymsystems anzusehen ist und als sogenannte "gemischte Funktionsoxydase" einer Reihe physiologischer Substrate als Bindungsstelle dient. Unter den physiologischen Substraten dieses Enzymsystems spielen die endogenen Steroidhormone nachgewiesenermaßen eine wesentliche Rolle.

H u t t e r e r et al. (1970) konnte weiter zeigen, daß Wirkungen der dihydroxylierten Gallensäure Chenodesoxycholsäure auf das mikrosomale Enzymsystem P-450 zeit- und dosisabhängig sind. H o f f m a n n und S m a l l hatten schon früher (1967) vermutet, daß die intrazelluläre Wirkung der Gallensäuren mit ihrer Detergentieneigenschaft in Verbindung zu bringen sind. D e n k et al. haben dann 1971 ausführliche Modelluntersuchungen mit den synthetischen Detergentien Triton X-15, X-100, X-305, N-101, CF 32 durchgeführt, um genauer abzuklären, ob die an sich unspezifische Detergentieneigenschaft für die morphologischen und funktionellen Veränderungen am Leberparenchym verantwortlich zu machen ist. In Serienuntersuchungen wurden gleichzeitig von S c h a f f n e r et al. 1971 im gleichen Arbeitskreis in-vivo-Experimente mit Gallengangsligationen zum Vergleich durchgeführt. Die in-vitro-Untersuchungen ergaben, daß synthetische Detergentien dosis- und zeitabhängig in drei Stadien mit der Funktion des mikrosomalen Elektronentransportsystems P-450 interferieren.

Im ersten Stadium kommt es zu einer kompetitiven Hemmung zwischen Detergentien und Substrat an der Lipoproteinregion des P-450-Enzymsystems. Das zweite Stadium bei längerer Exposition oder höherer Dosierung der Detergentien ist charakterisiert durch irreversiblen Verlust der Bindungsfähigkeit von bestimmten Substraten an das Enzymsystem. Im dritten Stadium wird die Elektronentransportkette unterbrochen durch Zerstörung des Enzymproteins. P-450 wird um-

gewandelt in eine inaktive lösliche Form P-420. Die Ähnlichkeiten zwischen der Wirkung von Detergentien und dihydroxylierten Gallensäuren in-vitro und gleiche Beobachtungen bei der Gallengangsligation in-vivo haben die Untersucher veranlaßt anzunehmen, daß die durch Cholestase verursachten pathologischen Phänomene morphologischer und funktioneller Art mit der detergentienartigen Wirkung der Gallensäuren auf das endoplasmatische Retikulum und sein "Biotransformationssystem" zu klaren ist.

Die folgende Hypothese wurde zur Diskussion gestellt:

In physiologischer Konzentration sind Gallensäuren für das Elektronentransportsystem P-450 normale Substrate. Sie akkumulieren wie andere endogene Substrate vom gleichen Typ (z.B. Steroidhormone) an der hydrophoben Bindungsseite des Enzyms. Bei Konzentrationsanstieg oder längerer unphysiologischer Einwirkungsdauer von Gallensäuren bei einer Cholestase wird die hydrophobe Region des Enzyms dem wässrigen Medium ausgesetzt und durch die micellare Lösungsvermittlung der Gallensäuren zerstört. Die Bindung der detergentienartig wirkenden Gallensäuren und die bei längerer Einwirkungsdauer oder höherer Konzentration gleichzeitig zu beobachtende Zerstörung der Bindungsseite erklärt die gemischte kompetitive reversible und nicht kompetitive, irreversible Hemmung lipoidartiger Substrate. Auf dem Boden dieser Hypothese sind Wechselwirkungen zwischen Gallensäuren, lipoidartigen Substraten oder solchen Substanzen, die eine intrazelluläre Eiweißbindung eingehen (wie z.B. BSP) und Steroidhormonen gut denkbar. Es liegt deshalb nahe, die Untersuchungen aus dem Arbeitskreis von Popper, Schaffner, Hutterer, Denk et al. (1971) auch zur Erklärung der kurzfristigen Einflüsse von BSP auf die hepatische Clearance von Cortisol zu übertragen und aus unseren Untersuchungen Analogschlüsse für den Einfluß einer Gallensäurenkonzentrationserhöhung

aus der gegenseitigen Wechselwirkung aller drei Substrate zu ziehen.

Nachdem durch die Untersuchungen von D a n z i n g e r und H o f f m a n n (1972) die orale Applikation von Gallensäuren, speziell von Chenodesoxycholsäure, in größerem Umfang beim Menschen mit der Absicht, eine Auflösung von Gallensteinen zu erreichen, angewandt worden war, ohne daß es dadurch zu Leberschädigungen kam, haben wir diese Möglichkeit ausgenutzt, um sozusagen als Nebenfund eine Aussage über den Einfluß einer parenteralen Langzeitapplikation von Gallensäuren auf den Cortisolstoffwechsel zu erhalten.

Wie bereits dargestellt, kam es unter den in der zweiten Versuchsreihe geschilderten Bedingungen zu einer Verkürzung der Cortisolhalbwertszeit sowohl in Einzelversuchen mit Lithocholsäure als auch in einer größeren Gruppe mit Chenodesoxycholsäure. Das Ergebnis scheint zunächst den Befunden der Kurzzeitversuche zu widersprechen. Während dort das biliär sezernierte BSP zu einer Verlängerung der Cortisolhalbwertszeit führte, zeigte sich nach sechswöchiger oraler Applikation der ebenfalls biliär sezernierten Gallensäuren eine höhere Metabolisierungsgeschwindigkeit für Cortisol. Dieses Phänomen ist eigentlich nur so zu erklären, daß über einen längeren Zeitraum applizierte Gallensäuren über den Weg einer substratinduzierten Enzymneubildung oder Aktivitätssteigerung zu einer schnellen Elimination führen und daß so toxische Konzentrationen wie unter den Bedingungen der Cholestase nicht erreicht werden. Diese Vorstellung ist mit der Beobachtung des schon lange bekannten choleretischen Effekts von Gallensäuren vereinbar. Der choleretische Effekt von Gallensäuren scheint dabei über eine längere Zeit mit einer Induktion von Enzymsystemen einherzugehen, die auch die Cortisolhalbwertszeit verkürzen. Eine wechselseitige Beziehung von Gallensäurensekre-

tionen auf der einen Seite und Cortisol-Sekretionsrate und Umsatz auf der anderen Seite scheint dabei sogar nicht ausgeschlossen zu sein, da auch die Gabe von Cortisol ihrerseits eine Cholerese zu induzieren vermag. Auf Grund der hier von uns vorgelegten Untersuchungen kann zur Zeit nur darüber spekuliert werden, um welche Enzyme es sich im einzelnen dabei handelt.

Weitergehende enzymologische Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um den letzten Beweis zu erbringen, ob das von uns vorgetragene Konzept richtig ist.

D. Zusammenfassung:

1. Der Einfluß von biliär sezernierten Substanzen (BSP) auf den Cortisolstoffwechsel zeigt eine Verlängerung der Cortisolhalbwertszeit.
2. Im Langzeitversuch applizierte Gallensäuren (Lithocholsäure bzw. Chenodesoxycholsäure) ergeben eine deutliche Verkürzung der metabolischen Halbwertszeit des Cortisols.

Auf der Grundlage der in unseren Versuchen erhaltenen Befunde darf man in Erweiterung bereits beschriebener pathogenetischer Mechanismen folgende Schlüsse ziehen:

1. Intrazelluläre Konzentrationserhöhungen von Substraten mit Detergentieneigenschaften können in bestimmten toxischen Bereichen kurzfristig zu einer teils reversiblen, teils irreversiblen Schädigung spezifischer Enzymsysteme in der Leber führen. Dadurch wird die Metabolisierungsgeschwindigkeit hormonaler Steroide, speziell des Cortisols, verlängert. Dieses Phänomen kann bei irreversibler Schädigung zur pathogenetischen Erklärung eines Teils der bekannten Funktionsstörungen der Nebennierenrinde bei Leberkrankheiten mit Cholestase beitragen.
2. Orale Langzeitapplikation von Gallensäuren bei Lebergesunden kann zu Induktion von Enzymsystemen führen, die den Umsatz von hormonalen Steroiden beschleunigen.

E. Literaturverzeichnis

1. Abraham und Staudinger
Spektroskopische Untersuchung zur fluorometrischen Steroidanalyse
Z. klin. Chem. 2 : 16 (1964)
(zitiert nach Dörner und Stahl)
2. Andrews, W.H.H.; T.G. Richards
The activity of bile salts and certain detergents on the hepatic storage and protein-binding of sulfobromophthalein
Quart. J. Exper. Physio. 45 : 275 (1960)
3. Berliner, D.L., Sivim H.E. and Dougherby, T.F.
Metabolism of 4-¹⁴C corticosterone fibroblasts, strain U 12-79
Biochim. Biophys. Acta 38 : 184 (1960)
4. Birke, G.
"Therole of the liver in the metabolism of 17. cetosteroids and corticosteroids"
in Martini G.A. :Aktuelle Probleme der Hepatologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 134 (1962)

5. Busch, J.E., Mahesh, V.R.

Metabolism of 11-oxygenated steroids

1. Influence of the A/B-ring junction on the
reduction of 11-oxogroups

Biochem. J. 71 : 705 (1956)

6. Danzinger, R.G., Hofmann, A.F., Schoenfield, L.J.
and Thistle, J.L.

Dissolution of cholesterol gallstones by
chenodeoxycholic acid

New Engl. J. of Med. 1: 5 (1972)

7. Daughaday, W.H.

Steroid protein interactions

Physiol Rev. 39 : 885 (1959)

8. Daughaday, W.H.

Binding of corticosteroids by plasma proteins

J. clin. Endocr. 21 : 53 (1961)

9. Denk, H., Schenkman, J.B., Bacchin, P.G., Hutterer, F.,
Schaffner, F., Popper, H.

Mechanism of cholestasis

A. Comparison between the effects of detergents,
the effect of bile acids, and the finding in bile
duct - ligated rats.

Exp. Molecul. Pathol. 14 : 263 (1971)

10. Dörner und Stahl

Die diagnostische Bedeutung einer einfachen
fluorometrischen Routinemethode zur Beurtei-
lung der Nebennierenrindenfunktion.

Dtsch. med. Wschr. 43 : 1917 (1965)

11. Gallagher, T.F. et al.

IV. Studies of the structural basis for
estrogen-induced impairment of liver function

medicine 45 : 471 (1966)

12. Gerdes und Staib

Eine einfache fluorometrische Methode zur
Bestimmung von Cortisol.

Klin. Wschr. 13 : 744 (1965)

13. Gerdes, H.

Die Funktionsänderung der Nebennierenrinde
bei Leberzirrhose (klin. und experimentelle
Untersuchungen zur formalen Pathogenese)

Habilitationsschrift Marburg 1970

14. Gerdes, H.

Studies on hepatic bile acid secretion and
its relationship with suprarenal steroid
metabolism in cholestasis patients

II. Bile acid Meeting Freiburg i.Br. 1972

15. Gerdes, Littmann, Kriebel

Untersuchung über die hepatische Gallen-
säuresekretion und ihre Beziehung zum Stoff -
wechsel der Nebennierenrindensteroiden bei
Patienten mit Cholestase
Zeitschrift für Gastroenterologie 2 : 78 (1972)

16. Hellman, H., Bradlow, H.L., Zumoff, B., Fukushima, D.K.,
Gallagher, T.F.

Thyroid-androgen interrelations and the
hypercholesteremic effect of androsterone
J. clin. Endocr. 19 : 936 (1955)
(zitiert nach W. Wortmann, 1969)

17. Hübener und Staib

Biochemie der Nebennierenhormone
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1962

18. Hoffmann und Small

Detergent properties of bile salts:
correlation with physiological function
Am. Rev. med. 18 : 333 (1967)

19. Hutterer, F., Denk, H., Bacchin, P.G., Schenkman, J.B.
Schaffner, F., Popper, H.

Mechanism of cholestasis

1. Effects of bile salts on microsomal
Cytochrome P 450 dependent biotransformation
system in vitro
Life Science 9 : 877 (1970)

2. Effects of bile acids on the microsomal
electron transfer System in vitro

Life Science 9 : 1159 (1970)

(beide Textstellen sind nach der Dissertation
von Kriebel Marburg 1973 zitiert)

20. Hutterer F., Bacchin, P.G., Raisfeld, I.H., Schenk-
mann, J.P., Schaffner, F., Popper, H.

Alteration of biotransformation in the liver
in cholestasis

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133 : 702 (1970)

21. Javitt, N.B.

Clinical and Experimental aspects of
sulfobromophtalein and related compounds

22. Javitt, N.B.

Glutathione: role in conjugation in the liver
Am. J. Med. 30 : 341 (1961)

23. Kriebel, U.

Untersuchung über die hepatische Gallensäure-
sekretion und ihre Beziehung zum Stoffwechsel
der Nebennierenrindensteroiden bei Patienten
mit Cholestase.

Dissertationsschrift Marburg 1973

24. Macarol, V., Morris, T.A., Baker, K.J. and Bradley, S.E.
Hydrocortison choleresis in Dog
J. clin. Invest. 49 :1714 (1970)
25. Mills, J.H., Schedl, H.P., Chen, P.S.Jr. and Barrter, F.C.
The effect of estrogen administration on the
metabolism and protein binding of hydrocortison
J. clin. Endocr. 22 : 587 (1962)
26. Neal, G., Lewis, B., Weaver, V., Pannevellivalla, D.
Serum bile acids in liver desease
gut: 12 : 145 (1971)
27. Peterson, R.E., Wyngaarden, J.B., Guerra, S.L.,
Brodie, B.B. and Bunim, J.J.
The physiological disposition and metabolic
fate of hydrocortison in man
J. clin. Invest. 34 : 1779 (1955)
28. Quarfordt, H.S., Hilderman, H.L., Valle, D. and Wandell, E.
Compartmental analysis of sulfobromophthalein
transport in normal patients and patients with
hepatic dysfunction
Gastroenterology 60 : 246 (1971)
29. Schaffner, F. und Popper, H.
Cholestasis in the result of hypoactive
hypertrophic smooth endoplasmatic reticulum
in the hyptocytes
Lancet 2 : 355 (1969)

30. Song, Ch.S., Rifkind, A.B., Gilette, P.N., Kappas, A.
Hormones and the liver
The effect of estrogens progesterone and
pregnancy on hepatic function
An. J. Obst. and Gynec. 1 : 813 (1969)
31. Sweat, M.
Sulfuric acid induced fluorescence
of corticosteroids
Analyt. Chem. 26 : 772 (1954)
32. Zondek, B.
Über das Schicksal des Follikelhormons im
Organismus
Skand. Arch. Physiol. 70 : 133 (1934)
33. Zumoff, B., Bradlow, H.L., Gallagher, T.F., Hellman, L.
Cortisol metabolism in Cirrhosis
J. clin. Invest. 41 : 1735 (1967)
34. Zumoff, B., Bradlow, H.L., Cassouto, J., Gallagher, T.F.,
and Hellman, L.
Reversible reproduction of the abnormal
cortisol metabolic pattern of cirrhosis by
administration of norethandrolone
J. clin. Endocr. 28 : 92 (1968)

Meine akademischen Lehrer waren:

Barthelmai, Berendes, Buchholz, Daume,
Dimroth, Dölle, Exner, Friederich, Ganz,
Gerdes, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Hort,
Karlson, Klaus, Nöth, Linneweh, Martini,
Petry, Pots, Reim, Riecken, Rodeck, Rohen,
Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel,
Siegert, Strohmeyer, Welge-Lüssen, Willenbockel,
Walcher.

Lebenslauf

Am 17. Sept. 1947 wurde ich als Sohn des Versicherungsangestellten Karl-Heinz Riemenschneider und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Hilgenberg, in Bad Wildungen geboren.

Volksschulbesuch von 1954 bis 1958, Mittelschule von 1958 - 1960 in Borken Bez. Kassel, anschließend von 1960 bis 1962 Besuch der August-Vilmar-Schule in Homberg/Efze. Von 1962 - 1967 besuchte ich dann die Winfried-Schule in Fulda, wo ich 1967 das Abitur ablegte.

Von 1967/68 bis 1973 studierte ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn Humanmedizin.

Bestand 1968 das Vorphysikum

1970 das Physikum

1973 die ärztliche Prüfung

Am 1. Dezember 1973 trat ich meine erste Medizinalassistentenstelle in Fulda am dortigen Stadtkrankenhaus an.

